

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/33057 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11958

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. Oktober 2001 (16.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 51 175.9 16. Oktober 2000 (16.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard  
[DE/DE]; Merowingerstrasse 1, 67136 Fussgönheim (DE).  
SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen 3, 70329  
Stuttgart (DE). MERKL, Rainer [DE/DE]; Silberkuh-  
lenweg 5, 37120 Bovenden (DE). BLASCO, Francesca  
[IT/DE]; Achalmstrasse 91, 73734 Esslingen (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Kinzebach &  
Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/33057 A2

(54) Title: CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES CONSISTING OF THERMOPHILIC BACTERIA

(54) Bezeichnung: CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN AUS THERMOPHILEN BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien

Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren  
5 Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen die Fähigkeit technisch interessante Oxygenierungsreaktionen zu katalysieren und werden daher seit einiger Zeit intensiv untersucht. So wurde beispielsweise die Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3  
10 aus *Bacillus megaterium* isoliert und charakterisiert und ist mittlerweile auf rekombinantem Weg zugänglich (vgl. z.B. DE-A-199 35 115).

Diese Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und  
15 Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome.

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen  
20 geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Durch gezielte Einführung von Punktmutationen ist es zwischenzeitlich gelungen, das Substratspektrum dieses Enzyms zu erweitern. So können nunmehr auch kürzer- als  
25 auch längerkettige Carbonsäuren, Alkane, Alkene, Cycloalkane, Cycloalkene und verschiedenste Aromaten durch dieses Enzym oxidiert werden (vgl. DE-A-199 35  
30 115, 199 55 605, 100 11 723 und 100 14 085).

Um die industrielle Anwendbarkeit dieser Enzymklasse weiter zu verbessern, wäre es daher wünschenswert neue Cytochrom P450-Monooxygenasen zu finden, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind, wie z.B. Enzyme mit erhöhter thermischer Stabilität.

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind

- 10 Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 und vorzugsweise außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.

15

- Erfindungsgemäß bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenasen weisen eine Aminosäuresequenz auf, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäure aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis  
20 Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.

Eine besonders bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenase besitzt eine Aminosäuresequenz, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

- 25 Erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monooxygenasen sind insbesondere aus thermophilen Bakterien, vorzugsweise der Gattung *Thermus* sp., wie z.B. der Spezies *Thermus thermophilus*, Stamm HB27 (hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM7039) isolierbar. „Thermophile“ Bakterien erfüllen erfindungsgemäß die Temperaturtoleranzkriterien nach H.G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Thieme  
30 Verlag Stuttgart, 5. Auflage, Seite 173, für thermophile und extrem thermophile Organismen (d.h. Wachstumsoptimum bei über 40 °C).

Die erfindungsgemäßen Monooxygenase sind vorzugsweise durch eine erhöhte Temperaturstabilität gekennzeichnet. Diese drückt sich in einem in Vergleich zum P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* geringeren Aktivitätsverlust bei erhöhter Temperatur (z.B. in einem Bereich von 30 bis 60 °C, pH 7,5, 25mM Tris/HCl) aus.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird erfindungsgemäß eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus dem thermophilen Bakterium *T. thermophilus* bereitgestellt. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 44 kDa (bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese), ist löslich und zeigt im reduzierten Zustand, oxidierten Zustand und als Carbonyl-Addukt ein Absorptionsspektrum analog zu dem anderer P450 Enzyme. Aus Sequenzvergleichen dieses erfindungsgemäßen Enzyms aus *T. thermophilus* und anderen bekannten P450 Enzymen konnten folgende Identitäten bestimmt werden: P450 BM3, 32% Identität; CYP119, 29% Identität; P450eryF, 31% Identität. Das erfindungsgemäße Enzym zeigt eine außerordentliche Thermostabilität, veranschaulicht durch eine Schmelztemperatur von etwa 85°C, welcher Wert um 30°C über demjenigen für P450cam liegt.

20

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Oligonukleotide, welche mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren, die für eine erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.

25

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung auch solche Oligonukleotide, welche eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 30 bis 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO:1.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition hybridisieren und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren, insbesondere eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus anderen Mikroorganismen, wie z.B. solchen der Gattung *Thermus* sp..

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere auch Polynukleotide, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition kodieren, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.

- 5 Bevorzugte Polynukleotide sind solche, die im wesentlichen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzen, sowie die dazu komplementären und davon abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskassetten zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Monooxygenasen, umfassend wenigstens  
10 eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit wenigstens einer der oben angegebenen Polynukleotide.

- Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen rekombinanter Vektoren, welche  
15 wenigstens ein Polynukleotid oder wenigstens eine Expressionskassette gemäß obiger Definition tragen; sowie Mikroorganismen, enthaltend wenigstens einen solchen rekombinanten Vektor; sowie Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Cytochrom P450 Monooxygenasen, bei welchen man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus  
20 der Kultur isoliert.

- Die erfindungsgemäßen Enzyme und davon ableitbaren Mutanten sind als Biokatalysatoren für unterschiedliche biochemische Oxygenierungsreaktionen organischer Verbindungen von technischer Bedeutung brauchbar. In analoger Weise sind auch  
25 die erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismen zur Durchführung solcher Oxygenierungsreaktionen einsetzbar.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit  
30 wenigstens einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase umsetzt.

Vorzugsweise wird dieses Verfahren so durch geführt, dass man

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in

einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen (von außen zuge-  
setzten) oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche  
ein Substrat der Monooxygenase ist, vorzugsweise in Gegenwart von  
Sauerstoff und gegebenenfalls einem Elektronendonator, kultiviert; oder

- 5       a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium, vorzugsweise in Gegenwart  
von Sauerstoff und einem Elektronendonator, mit einer erfindungsge-  
mäßigen Cytochrom P450 Monooxygenase inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem  
Medium isoliert.

10

Das exogene oder intermediär gebildete Substrat kann dabei ausgewählt sein unter:

- a) ~~gegebenenfalls substituierten -N-, -O- oder -S-heterocyclischen ein-,~~  
zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- 15       c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und
- e) aliphatischen, vorzugsweise terminal gesättigten, Carbonsäuren.

20       Nach einer ersten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird  
die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff  
bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20 °C und einem pH-Wert  
von etwa 6 bis 9 durchführt.

25       Nach einer zweiten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt  
man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den  
oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zu und führt die Oxidation durch  
enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauer-  
stoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa  
6 bis 9 durch, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Sub-  
30       strat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten  
(Elektronendonator) enthält.

Obige Verfahren können bevorzugt in Bioreaktoren durchgeführt werden. Gegenstand der Erfindung sind daher solche Bioreaktoren, umfassend wenigstens eine erfindungsgemäße Monooxygenase oder wenigstens einen rekombinanten Mikroorganismus, gegebenenfalls jeweils in immobilisierter Form.

5

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, eines Vektors oder eines Mikroorganismus gemäß vorliegender Erfindung zur mikrobiologischen Oxidation oben genannter organischer Verbindungsklassen.

10 Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 einen Sequenzvergleich von P450 aus *Thermus thermophilus* mit der Häm-Domäne von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. Doppelt unterstrichen ist dabei die Häm-Bindungsstelle gezeigt (Cys400 in P450 BM3 ist der Cysteinrest, der mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe koordiniert). Einfach unterstrichen ist die Region die in Kontakt steht mit dem T-Ende der Fettsäurekette. Die Grad der Übereinstimmung ist durch verschiedenen Symbole gekennzeichnet ("\*" = identische Reste; ":" und "." = ähnliche Reste).

20

Figur 2 zeigt das Ergebnis eines Vergleichstests zur Bestimmung der Thermostabilität von P450 BM3 und P450 aus *Thermus* sp.. Die Thermostabilität wurde spektrometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500nm über den Häm-Gruppen-Gehalt bestimmt.

25

Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente“ der konkret offenbarten neuen P450 Monooxygenasen.

30

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Monooxygenasen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Enzyme, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreaktionen a) bis e) besitzen und /oder im Vergleich zu P450 BM3 eine erhöhte Thermostabilität, z.B. bei Temperaturen im Bereich von et-

wa 30 bis 60 °C und gegebenenfalls höheren Temperaturen nach 30-minütiger Behandlung in 25mM Tris/HCl, besitzen.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere  
5 Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere, wie z.B. 1 bis 30 oder 1 bis 20 oder 1 bis 10, Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen er-  
10 hältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Enzym qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unter-  
15 schiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ weisen eine von SEQ ID NO:2 in mindestens einer Position abweichende Aminosäuresequenz auf, wobei die Veränderung in der Sequenz die Monooxygenase Aktivität vorzugsweise nur unwesentlich, das heißt um nicht mehr als etwa  $\pm 90\%$ , insbesondere  $\pm 50\%$  oder nicht  
20 mehr als  $\pm 30\%$  verändert. Diese Veränderung kann unter Verwendung eines Referenzsubstrates, wie zum Beispiel  $\beta$ -Ionon, unter standardisierten Bedingungen (zum Beispiel 0,1 bis 0,5 M Substrat, pH-Bereich 6 bis 8, insbesondere 7; T = 60 bis 70°C, insbesondere 65°C) bestimmt werden.

25

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens 75% insbesondere wenigstens 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-  
30 2448.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins.

Homologe des erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenasen, welche aus anderen Organismen, z.B. aus anderen als den hierin konkret genannten Bakterien, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen z.B. zwei oder drei vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter

- besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z.B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z.B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromaten, wie Acridin, und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.
- Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl, oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroa-

tome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

5

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt werden n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z.B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

10

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopentan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nicht-limitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie  $\forall$  -,  $\exists$  - und ( -lonon, sowie die entsprechenden Methylionone und Isomethylionone.

15

Erfindungsgemäß oxidierbare, Substrate der Gruppe e) sind geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte  $C_8$ - $C_{30}$ -Carbonsäuren, insbesondere Monocarbonsäuren, oder Carbonsäurederivate davon, wie Ester und Amide. Als Beispiele sind terminal oder subterminal (T-1-, T-2- oder T-3-Position) hydroxylierbare gesättigte Monocarbonsäuren zu nennen.

20

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzeln- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen), kodierend für eine der obigen Monooxygenasen und deren funktionale Äquivalente. Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide,

25

30

kodieren aber weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-

Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, I-PR- oder im I-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, 5 CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>l</sub>P<sub>r</sub>-Promotor.

- 10 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion expri- 15 miert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort expriert und/oder überexprimiert wird.

- 20 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Trans- 25 lation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombi- 30 nations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Labo-

ratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- 5 Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)
- 10 entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

15

- Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.
- 20
- 25

- Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorga-
- 30

nismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enhaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen  $\lambda$  oder  $\phi$  oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen oder Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise  
5 in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und das Enzym nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch  
10 Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

15

Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren  
20 werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als  
25 Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer  
30

Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

- 5 Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

10

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen obigen Typs.

15

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Monooxygenaseproduktion in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

20

25

30

Wird die erfindungsgemäße Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem exogenes Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

5

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

10 Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

~~Allgemeine experimentelle Angaben:~~

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

15

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

20

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

25 PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl<sub>2</sub>, 8µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), je 1 µl Primer (0,1 µM), 1µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

30

c) Kultivierung von E.coli

Die Kultivierung von rekombinanten E. coli-Stämme DH5V wurde in LB-Amp Medium (Trypton 10,0g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H<sub>2</sub>O ad 1000 ml) bei 37 °C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer  
5 Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in E. coli erfolgte nach Erreichen eines OD<sub>578</sub>-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42 °C.

#### 10 d) Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g E. coli DH5V wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ul-  
15 traschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %) wurde die auf Eis gekühlte E. coli-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 mm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert, wobei man einen Rohextrakt erhält.

20

#### Beispiel 1:

#### Klonierung und Expression von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 und den His-tag-Derivaten davon

25

##### 1. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27

Die kodierende P450-Sequenz (blunt ended) wurde in die HincII-Schnittstelle des Plasmids pTZ19R (MBI Fermentas) einkloniert. Aus dem so erhaltenen Plasmid  
30 TTHB66 wurde die kodierende P450-Sequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (*kursiv gedruckt*) als Teil des P450-ATG-Startcodons:

5'-CGAAGCT*CATATGA*AGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7).

5 b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (*kursiv gedruckt*) als Teil des TGA-Stopcodons: 5'-

GCGAATTCACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI-Schnittstellen des Vektors pCYTEXP1 (Plasmid mit dem temperaturinduzierbaren  $P_{RPL}$ -Promotorsystem des Bakteriophagen 8 (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26:147)) kloniert und in E. coli DH-5 $\alpha$  (Clontech, Heidelberg) transformiert.

E. coli DH-5 $\alpha$ , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [ $\mu$ M]
4	0,092	0,056
8	0,176	0,106
24	0,106	0,064

2. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit N-terminalem His-tag

Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

- (a) 50-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Startcodons und die tag-codierenden Codons (unterstrichen):

5 5'-CGAAGCTCATATGCATCACCATCATCATCACAAAGCGCCTTTC (SEQ ID NO:9);

- (b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons :

10 5'-GCGAATTCACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 kloniert und in E. coli DH-5 $\alpha$  exprimiert.

- 15 E. coli DH-5 $\alpha$ , enthaltend das interessierende Plasmid, wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum
- 20 von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [ $\mu$ M]
4	ND	ND
8	0,097	0,073
24	0,111	0,073

3. Clonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit C-terminalem His-tag

Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

- (a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-Codons:

5'-CGAAGCTCATATGAAGCGCCTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7)

- (b) 47-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons sowie die unterstrichene tag-codierende Teilsequenz:

5'-CGGAATTCAGTGATGATGATGGTGATGCGCCCGCACCTCCTC (SEQ ID NO:10).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 cloniert und in *E. coli* DH-5 $\alpha$  exprimiert.

- 15 *E. coli* DH-5 $\alpha$ , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum
- 20 von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [ $\mu$ M]
4	ND	ND
8	0,1	0,075
24	ND	ND

Beispiel 2:

Bestimmung der Thermostabilität von P450 aus *Thermus thermophilus* im Vergleich zu P450 BM3

Die beiden Enzyme wurden jeweils 30 Minuten in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25mM bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend abgekühlt und die P450 Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt und in Figur 2 graphisch dargestellt.

5

Temperatur [°C]		30	40	50	60
P450 Konzentration [%]	P450 thermus	100	89	29	22
	P450 BM3	92	63	0	0

Wie man den Versuchsergebnissen entnimmt, besitzt das erfindungsgemäße Enzym nach 30-minütiger Inkubation bei allen Temperaturen eine signifikant höherer Temperaturstabilität.

### Beispiel 3:

#### 15 Biotransformationsexperimente

Der endogene Redoxpartner für die erfindungsgemäße Cytochrom P450 aus *T. thermophilus* konnte bisher noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Es konnte jedoch beispielsweise Enzymaktivität bei der Hydroxylierung von  $\beta$ - und/oder  $\alpha$ -lonon beobachtet werden. Mit  $\beta$ -lonon als Substrat konnte die Umwandlung zu einem Hauptprodukt beobachtet werden, wohingegen  $\alpha$ -lonon zu einem Produktgemisch umgesetzt wurde. Durch Vergleich mit synthetischen Standards konnte festgestellt werden, daß das Hauptprodukt der  $\beta$ -lonon-Umwandlung 4-Hydroxy- $\beta$ -lonon ist.

25

Vorkulturen von *T. thermophilus* [5 ml Medium Tt (2 g Hefeextrakt, 1g Trypton, 1g NaCl in 500 ml entionisiertem Wasser)] wurden aus Agarplatten-Kulturen inokuliert und 24 Stunden bei 65°C unter Schütteln (150 Upm) inkubiert. Anschließend wurde 100 ml Medium Tt mit der Vorkultur inokuliert und bei 65°C unter Schütteln inkubiert.

30

$\beta$ -Ionon (107  $\mu$ l/ml Kultur) wurde jeder Kultur nach 24 Stunden zugesetzt. Die Kultivierung wurde 78 Stunden fortgesetzt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und der Überstand mit Diethyläther extrahiert. Der Extrakt wurde durch GC und TLC analysiert. Kontrollkulturen ohne Substrat wurden unter den gleichen Bedingungen hergestellt und analysiert.

5

Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.  
5
2. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.  
10
3. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.  
15
4. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.  
20
5. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche aus Bakterien der Gattung *Thermus* sp..
- 25 6. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 5, aus einem Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus*.
7. Oligonukleotid, welches mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisiert, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert.  
30
8. Oligonukleotid nach Anspruch 7, welches eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 45 aufeinanderfol-

gende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO:1.

- 5 9. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 7 oder 8 hybridisiert und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.
10. Polynukleotid, das für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.
- 10 11. Polynukleotid nach Anspruch 10 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, sowie die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz.
- 15 12. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11.
13. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 12 trägt.
- 20 14. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 13.
15. Verfahren zur Herstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom  
25 P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.
16. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer Cytochrom P450 Monooxygenase  
30 nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umsetzt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man  
a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in einem

27

KulturmEDIUM, in Gegenwart der exogenen oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, kultiviert; oder

- 5 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und  
b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter

- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;  
b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;  
c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;  
15 d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und  
e) aliphatischen (terminal gesättigten) Carbonsäuren.

- 20 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

- 25 20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.  
30

21. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in immobilisierter Form.

22. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6, eines Vektors nach Anspruch 13, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 14 zur mikrobiologischen Oxidation von

5

- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen und/oder
- e) aliphatischen Carbonsäuren.

10

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

&lt;120&gt; Neue thermophile Cytochrom P450 Monooxygenasen

&lt;130&gt; M/41524

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1170

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thermus thermophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1170)

&lt;400&gt; 1

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc	48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu	
1 5 10 15	
cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc	96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro	
20 25 30	
cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35 40 45	
ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	
acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	
acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	
ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc gcc tac cgg gag gcc atg gag gag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	

ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc 480  
 Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala  
 145 150 155 160

ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac 528  
 Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp  
 165 170 175

ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc 576  
 Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg  
 180 185 190

gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga 624  
 Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg  
 195 200 205

gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag 672  
 Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu  
 210 215 220

acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc 720  
 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg  
 225 230 235 240

ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc 768  
 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala  
 245 250 255

gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc 816  
 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr  
 260 265 270

cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg 864  
 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Glu Glu Asp Arg Leu Pro Pro  
 275 280 285

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912  
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe  
 290 295 300

ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960  
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly  
 305 310 315 320

acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008  
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys  
 325 330 335

ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056  
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala  
 340 345 350

ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104  
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu  
 355 360 365

gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg 1152  
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg  
 370 375 380

gag gag gtg cgg gcg tga 1170

Glu Glu Val Arg Ala  
385 390

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 2

Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu  
1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro  
20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp  
35 40 45

Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala  
50 55 60

Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu  
65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp  
85 90 95

Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu  
100 105 110

Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu  
115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu  
130 135 140

Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala  
145 150 155 160

Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp  
165 170 175

Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg  
180 185 190

Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg  
195 200 205

Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu  
210 215 220

Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg  
225 230 235 240

Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala  
245 250 255

Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr  
260 265 270

Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro  
 275 280 285

Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe  
 290 295 300

Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly  
 305 310 315 320

Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys  
 325 330 335

Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala  
 340 345 350

Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu  
 355 360 365

Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg  
 370 375 380

Glu Glu Val Arg Ala  
 385

<210> 3

<211> 1188

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(21)

<223> His tag

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal  
 his tagged

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 3

atg cat cac cat cat cat cac aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg 48  
 Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp  
 1 5 10 15

ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg 96  
 Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala  
 20 25 30

tgg ggc cgg gcc cac ccc cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc 144  
 Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro  
 35 40 45

ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc 192  
 Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala  
 50 55 60

gag ggg acc acc aag gcc acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc	240
Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu	
65 70 75 80	
acg ggg agg ggc ctc ctc acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg	288
Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala	
85 90 95	
cgc aag gcc ctc aaa gac ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac	336
Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr	
100 105 110	
cgg gag gcc atg gag gag gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg	384
Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg	
115 120 125	
ggg gag gag cgg gac ctg gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc	432
Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
ctc ctc ggg cgg gcc ctc ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg	480
Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala	
145 150 155 160	
gag cac gcc ctt aag gcc ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc	528
Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser	
165 170 175	
ccc ctg gcc ctc ctg gac ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac	576
Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp	
180 185 190	
cgg ggg gcc ctc tac cgc gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc	624
Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro	
195 200 205	
ctc tcc cac ctt ccc cga gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc	672
Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu	
210 215 220	
ctg gtg gcg ggc cac gag acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt	720
Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe	
225 230 235 240	
ctc ctc ctc tcc cac cgc ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc	768
Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser	
245 250 255	
gag gag gcg gcc ctc gcc gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc	816
Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro	
260 265 270	
ccc gcc tgg atc ctc acc cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga	864
Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly	
275 280 285	
gag gac cgg ctc ccc ccg gcc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg	912
Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val	
290 295 300	
acc cag agg ctc cac ttc ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc	960

Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg  
 305 310 315 320  
 ttc ctg gag gaa agg ggg acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc 1008  
 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly  
 325 330 335  
 ctg ggg cag agg ctc tgc ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc 1056  
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly  
 340 345 350  
 ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc 1104  
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu  
 355 360 365  
 ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg 1152  
 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly  
 370 375 380  
 ctt ccc gcg cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga 1188  
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala  
 385 390 395

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 395

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal  
 his tagged

&lt;400&gt; 4

Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp  
 1 5 10 15  
 Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala  
 20 25 30  
 Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro  
 35 40 45  
 Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala  
 50 55 60  
 Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala  
 85 90 95  
 Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr  
 100 105 110  
 Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg  
 115 120 125  
 Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala  
 145 150 155 160

Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser  
 165 170 175  
 Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp  
 180 185 190  
 Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro  
 195 200 205  
 Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu  
 210 215 220  
 Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser  
 245 250 255  
 Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro  
 260 265 270  
 Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly  
 275 280 285  
 Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val  
 290 295 300  
 Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly  
 325 330 335  
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly  
 340 345 350  
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu  
 355 360 365  
 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly  
 370 375 380  
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala  
 385 390 395

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1188

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc feature

&lt;222&gt; (1168) .. (1185)

&lt;223&gt; His tag

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: C-terminal  
 His-tagged

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1188)

&lt;400&gt; 5

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc	48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu	
1 5 10 15	
cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc	96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro	
20 25 30	
cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35 40 45	
ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	
acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	
acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	
ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	
ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc	480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala	
145 150 155 160	
ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac	528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc	576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	
180 185 190	
gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga	624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	
195 200 205	
gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag	672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	
210 215 220	

acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc 720  
 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg  
 225 230 235 240

ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc 768  
 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala  
 245 250 255

gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc 816  
 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr  
 260 265 270

cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg 864  
 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro  
 275 280 285

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912  
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe  
 290 295 300

ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960  
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly  
 305 310 315 320

acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008  
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys  
 325 330 335

ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056  
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala  
 340 345 350

ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104  
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu  
 355 360 365

gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg 1152  
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg  
 370 375 380

gag gag gtg cgg gcg cat cac cat cat cat cac tga 1188  
 Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His  
 385 390 395

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 395

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal  
 His-tagged

&lt;400&gt; 6

 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu  
 1 5 10 15

 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro  
 20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp

35	40	45
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala 50 55 60		
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu 65 70 75 80		
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp 85 90 95		
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu 100 105 110		
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu 115 120 125		
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu 130 135 140		
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala 145 150 155 160		
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp 165 170 175		
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg 180 185 190		
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg 195 200 205		
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu 210 215 220		
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg 225 230 235 240		
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala 245 250 255		
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr 260 265 270		
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro 275 280 285		
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe 290 295 300		
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly 305 310 315 320		
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys 325 330 335		
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala 340 345 350		
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu 355 360 365		

Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg  
370 375 380

Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His  
385 390 395

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 7

cgaagctcat atgaagcgcc ttccctgag

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 8

gcgaattcac gccgcacct cctccctagg

30

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9

cgaagctcat atgcatcacc atcatcatca caagcgctt tc

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 10

cgggaattcag tgatgatgat ggtgatgogc ccgcacctcc tc

42

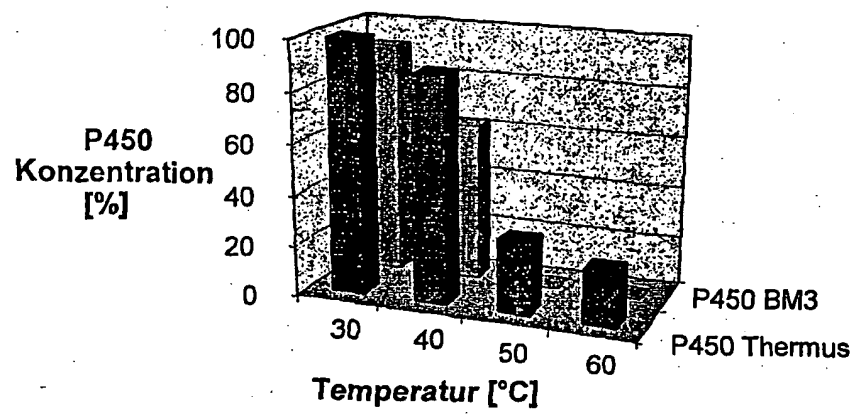
1/2

**Fig. 1**

P450 BM3	TIKEMPQPKTFGELKNPLPLNTDKPKVQALMKIADELGEIIFKFEAPGRVTRTYLSSQRLIKE	60
P450 thermus	-MKRLSLREAWPYLKDLQD---PLAVLLAWGRAHPRLFLPLPREPLALIFDPE-GVEG	54
	:*.:. ::: **:* :* :.*. :.* :. :. :. :. :. :. :.	
P450 BM3	ACDESFRDKNLSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMV	120
P450 thermus	ALLAEGITKATFYRALSR-LTGRGLLTDWG--ESWKEARKALKDPFLPKNVRGYREAME	111
	* . * * : * : * * * . * . : * * : * * : * * : * *	
P450 BM3	DIAVQLVQKWERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFSFYRDQPHPFITSMVRA	180
P450 thermus	EEARAFFGEWR---GEERDLDEHMLALSLRLLGRALFGKPLSPSLAEH-----ALKA	160
	: * : . : * . * . : . : * * * : * . * . : . . : : * : * *	
P450 BM3	LDEAMNKLQРАНPDDPAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDDLLTHMLNG	240
P450 thermus	LDRIMAQTR--SPLALLDLAAEARFR-----K--DRGALYREAEALIVHPPLS	204
	** . * : : * : *	
P450 BM3	KDPETGEPLDDENIRYQIITFLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEARVLVD	300
P450 thermus	HLP-----RERALSEAVTLLVAGHETVASALTWSFLLSHRPDWQKRVAESEEALAA	257
	: * . : . *	
P450 BM3	PVPSYQVQKQKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLI PQ	360
P450 thermus	-----FQEALRLYPRAWILTRLERPLLGE-EDRLPPG-TTLVLSPVY	298
	: : : : : : : * : : : : : : : * * * * * : : : : : *	
P450 BM3	HRDKTIWGDDVEEFRPERFENPNSAIPQHAFFKPGNGORACIGOOFFALHEATVLVGMMLKH	420
P450 thermus	TQRLHFP--DGEAFRPERFLEERGTPSGRYFPFGLGQRLCLGRDFALLEGPVILRAFFRR	356
	: : * * * * * : . * : * * * * * : : : : * * : : : *	
P450 BM3	FDDEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVAKSKKIPLGGIPS-PSTEQSACKVR	471
P450 thermus	FRLDPLP--FPRVLAQVTLRPE-----GGLPARPREEVRA---	389
	* : : . : : * * * * * : : : : * * * * * : * * *	

2/2

Fig.2



BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/033057 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/53,  
9/02, C12Q 1/68, C12P 1/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11958

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. Oktober 2001 (16.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 51 175.9 16. Oktober 2000 (16.10.2000) — DE —

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, 67136 Fussgönheim (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen 3, 70329 Stuttgart (DE). MERKL, Rainer [DE/DE]; Silberkuhlenweg 5, 37120 Bovenden (DE). BLASCO, Francesca [IT/DE]; Achalmstrasse 91, 73734 Esslingen (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 3. Oktober 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/033057 A3

(54) Title: CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES CONSISTING OF THERMOPHILIC BACTERIA

(54) Bezeichnung: CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN AUS THERMOPHILEN BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 01/11958

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12Q1/68 C12P1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 085 (C-015), 18 June 1980 (1980-06-18) & JP 55 048391 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD), 7 April 1980 (1980-04-07) abstract  --- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2002

Date of mailing of the international search report

31/07/2002

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sirim, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/11958

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATO RYUICHI ET AL: "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, <i>Thermus thermophilus</i> HB27." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 20, 1997, pages 6499-6503, XP002205721 ISSN: 0021-9193 page 6503, last paragraph -& DATABASE EMBL 'Online! 29 October 1997 (1997-10-29) Database accession no. AB001637 XP002205722 abstract	7-9, 12-14
X	----- DATABASE EMBL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) SASAKI T ET AL: "Oryza sativa nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 6, PC clone: P0514G12" Database accession no. Q9SNG3 XP002205723 abstract	1,5,6
X	----- DATABASE EMBL 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01) ZAMORANO J. P. ET AL: "Isolation and characterization of cDNA for mRNAs regulated during cold storage of avocado fruit" Database accession no. Q9M4L1 XP002205724 abstract	1,5,6
X	----- DATABASE EMBL 'Online! 1 November 1998 (1998-11-01) ALTENBUCHNER J: "Amplifiable element AUD4 from <i>Streptomyces lividans</i> 66." Database accession no. 085697 XP002205725 abstract	1,2,5,6
X	----- DATABASE EMBL 'Online! 30 May 2000 (2000-05-30) FLEISCHMANN R. D. ET AL: "Whole genome comparison of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical and laboratory strains" Database accession no. 069653 XP002205726 abstract	1-6
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/11958

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PARK H-J ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NADH OXIDASE FROM THE THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB8" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 205, no. 3, 1992, pages 881-885, XP001084250 ISSN: 0014-2956 the whole document</p>	1-15,21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/11958

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 55048391	A	07-04-1980	JP 1359753 C	30-01-1987
			JP 61025352 B	14-06-1986
<hr/>				

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12Q1/68 C12P1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 085 (C-015), 18. Juni 1980 (1980-06-18) & JP 55 048391 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD), 7. April 1980 (1980-04-07) Zusammenfassung  --- -/--	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nützlich ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juli 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

31/07/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sirim, P

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KATO RYUICHI ET AL: "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, Thermus thermophilus HB27." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 20, 1997, Seiten 6499-6503, XP002205721 ISSN: 0021-9193 Seite 6503, letzter Absatz -& DATABASE EMBL 'Online! 29. Oktober 1997 (1997-10-29) Database accession no. AB001637 XP002205722 Zusammenfassung	7-9, 12-14
X	DATABASE EMBL 'Online! 1. Mai 2000 (2000-05-01) SASAKI T ET AL: "Oryza sativa nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 6, PC clone: P0514G12" Database accession no. Q9SNG3 XP002205723 Zusammenfassung	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online! 1. Oktober 2000 (2000-10-01) ZAMORANO J. P. ET AL: "Isolation and characterization of cDNA for mRNAs regulated during cold storage of avocado fruit" Database accession no. Q9M4L1 XP002205724 Zusammenfassung	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online! 1. November 1998 (1998-11-01) ALTENBUCHNER J: "Amplifiable element AUD4 from Streptomyces lividans 66." Database accession no. 085697 XP002205725 Zusammenfassung	1,2,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online! 30. Mai 2000 (2000-05-30) FLEISCHMANN R. D. ET AL: "Whole genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains" Database accession no. 069653 XP002205726 Zusammenfassung	1-6

-/-

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PARK H-J ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NADH OXIDASE FROM THE THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB8" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 205, Nr. 3, 1992, Seiten 881-885, XP001084250 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p>	1-15,21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Akkennzeichen

PCT/EP 01/11958

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 55048391 A	07-04-1980	JP 1359753 C JP 61025352 B	30-01-1987 14-06-1986